动 物 学 研 究 2000, Jun. 21 (3): 177～180
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

β-银环蛇神经毒素结合蛋白的分离纯化

沈国光 徐 科
(中国科学院上海生理研究所 上海 200031 shengg@sunm.shcnc.ac.cn)

摘要: 大鼠膈肌神经突触前膜上存在β-银环蛇毒素结合蛋白。膈肌经匀浆、去垢剂抽提、离子交换层析、植物凝集素亲和层析及银环蛇毒素亲和层析，可获得纯化的β-银环蛇毒素结合蛋白。其比结合活性达1 nmol/mg蛋白质。整个纯化过程的总得率为3%。纯化蛋白制品的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱显示，有两个共纯化的多肽链，其分子量分别为61和69 kD。

关键词: β-银环蛇毒素结合蛋白; 大鼠膈肌; 亲和层析; 纯化
中图分类号: Q959.6^{+}2 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2000)03-0177-04

由于神经细胞质膜上的多种离子通道和受体是神经毒素的天然靶物质，所以神经毒素在这些膜蛋白的生理功能及结构性质研究中已成为十分有用的工具。从各种蛇毒分离的神经毒素可分为在突触后选择地阻遏神经肌肉接头传递的α型毒素以及突触前抑制递质释放的β型毒素两类。

α-银环蛇神经毒素作为一种突触后毒素在nACh受体的发现、鉴定、分离及结构功能研究中所起的关键性作用是众所周知的。但是，突触前过程及有关通道、受体的研究鉴定工作，除了神经胞吐作用，总体上进展有限。缺乏合适的探针是造成这种状况的原因之一。

90年代初国际上已有研究者从鸡脑突触体鉴定并初步纯化了突触前神经毒素、β-银环蛇毒素(β-BuTX)的结合蛋白(比结合活性约10 pmol/mg, Schmidt等,1988),并根据两种已知的K^{+}通道配体(dendrotoxin和MCD peptide)对其结合作用的抑制及有关电生理资料推定,该结合蛋白也是一种K^{+}通道(Dreyer等,1987;Stansfeld等,1987)。我们则从膈肌鉴定并初步纯化了β-BuTX结合蛋白。膈肌膜组分的去垢剂抽提液经DEAE离子交换层析和凝集素亲和层析处理,结合蛋白制品的比结合活性达到100 pmol/mg(沈国光等,1995b)。结合实验数据的Scatchard分析表明,结合蛋白与β-BuTX作用的平衡解离常数K_D值为4.9×10^{-9} mol/L。最近,我们通过进一步的亲和层析分离,即β-BuTX亲和层析和WGA亲和层析,使蛋白制品已近完全纯化。本文报告了有关的工作。

1 材料与方法

1.1 大鼠膈肌膜组分的制备

方法基本上按沈国光等,(1995a)所述进行。将15只S.D.大鼠(体重约250 g)断头处死,迅速剖腹取出膈肌,在冰浴上剪去中央腱和附带的脂肪,切碎,移入45 mL缓冲液A(20 mmol/L K-Hepes pH7.4,60 mmol/L KCl,1 mmol/L PMSF,0.01% NaN_3),在冰浴中用Polytron粉碎器匀浆,打3次,每次1 min。匀浆液经细尼龙网过滤除去结缔组织。然后以平均离心力17 000×g,高速离心30 min。弃去上清液,离心沉淀呈灰白色,用特氟隆-玻璃匀浆器将其分散重新悬浮于28 mL缓冲液A中。此重悬液即膈肌膜组分的粗制品,用于下一步的膜蛋白质抽提。整个实验过程,除特别注明外,均在4℃下进行。

1.2 膜蛋白的增溶抽提

用浓KCl溶液和20%的Triton X-100把上述膈肌膜悬液中这两种成分的浓度分别调至0.4 mol/L和1.5%,在4℃下缓缓搅拌3 h,进行抽提。而后加两倍体积的缓冲液B(20 mmol/L K-Hepes pH7.4;1 mmol/L PMSF;0.01% NaN_3;0.5% Tri-

收稿日期: 1999-09-13; 修改稿收到日期: 2000-01-31
基金项目: "八五"国家攀登计划"脑功能及其细胞和分子基础"项目基金资助

ton X－100;0.125%大豆磷脂及适量的蛋白酶抑制剂)稀释,再以47 000×g 高速离心1 h。取上清液,即去垢剂增溶的膜蛋白抽提液。本实验用 Folin-Lowry 方法测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白为标准。

1.3 β－银环蛇神经毒素亲和层析胶的制备

银环蛇毒素与 CNBr 活化的 Sepharose 4B 的偶联采用生产商(Pharmacia 公司)提供的方法进行。CNBr-Sepharose 4B 2 g 用 1 mmol/L HCl 进行溶胀、洗涤,而后在偶联缓冲液(0.1 mol/L $NaHCO_3$ pH8.3,0.5 mol/L NaCl)中与5 mg 银环蛇毒素室温下进行偶联反应2 h,再用1 mol/L 乙醇胺阻断游离的活性基团,然后用偶联缓冲液和醋酸缓冲液(0.1 mol/L Na-AcOH pH4,0.5 mol/L NaCl)轮流洗涤,最后在缓冲液 C(缓冲液 A 中含 1 mmol/L $CaCl_2$,5 mmol/L $MnCl_2$,0.5% Triton X－100 和 0.125%大豆磷脂)中平衡备用。

1.4 β－银环蛇神经毒素结合蛋白的纯化

将膜蛋白抽提液用缓冲液 B 再稀释一倍,使其 KCl 浓度低于 67 mmol/L,上 DEAE Sepharose CL 6B 离子交换层析柱(1 cm×20 cm),循环过夜,流速为35 mL/h。层析柱事先经缓冲液 C 平衡。上样后以100 mL 缓冲液 C 洗涤柱,再用含100 mmol/L KCl 的缓冲液 C 进行洗脱,流速14 mL/h。分部收集洗脱液,合并活性峰。

小扁豆凝集素(lentil lectin) Sepharose 4B 亲和层析凝胶2 mL 经缓冲液 C 平衡后,与上述离子交换层析洗脱液颠倒混合过夜,装柱后用40 mL 缓冲液 C 洗涤。再用缓冲液 C 配制的0.3 mol/L 甲基甘露糖苷溶液洗脱结合蛋白,流速1 mL/h,收集活性峰。

小扁豆凝集素亲和柱洗脱液上银环蛇毒素亲和层析柱(1 mL),流速10 mL/h,循环过夜。而后依次用缓冲液 C 和含0.1 mol/L KCl 的缓冲液 C 洗涤蛇毒亲和柱,再用含0.5 mol/L KCl 的缓冲液 C 洗脱结合蛋白。该洗脱液直接上经缓冲液 C 平衡的麦胚凝集素亲和柱(wheat germ lectin sepharose 6MB),流速2 mL/h,循环数次。然后用缓冲液 C 洗涤亲和柱,再用含0.1mol/L N－乙酰基葡萄糖胺的缓冲液 C 进行洗脱,流速0.5 mL/h。

1.5 同位素 ^{125}I 标记银环蛇神经毒素

采用氯胺 T 法标记毒素(Greenwood, 1963)。反应在 pH7.5 的磷酸钠缓冲液中进行,总体积200 μL,含 β－BuTX 50～200 μg,$Na^{125}I$ 37～185 MBq,加入氯胺 T 100～200 μg 后,反应1.5 min。以600 μg 偏重亚硫酸钠终止反应。并加入载体 KI 20 mg。反应混合液上 Sephadex G15 层析柱(1 cm×20 cm)分离毒素和游离的 $^{125}I^-$。^{125}I－β－BuTX 的比放射活性为180～950 MBq/mg 毒素蛋白。

1.6 膈肌银环蛇毒素结合蛋白结合活性的测定

将前节中抽提及层析分离各步的蛋白溶液100～20 μL 分别与 ^{125}I－β－BuTX(浓度为5 nmol/L)在室温下孵育25 min 进行结合反应。反应介质为含有1 mmol/L $CaCl_2$,5 mmol/L $MnCl_2$,0.1%牛血清白蛋白的缓冲液 A,总体积为200 μL。上述反应液中含有或不含相当于标记毒素浓度100倍的过量冷毒素,分别测定标记毒素与分离各步蛋白溶液的非特异性结合量及总结合量。反应后将反应液置于冰浴中,加入100 μL 饱和硫酸铵溶液沉淀蛋白。经玻璃纤维滤膜 Whatman GF/C(直径25 mm)抽滤,再以2×5 mL 25%硫酸铵溶液洗涤滤膜,将其置 γ 计数器中测定放射性计数。

1.7 材料与试剂

实验用 S.D. 大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供。同位素 $Na^{125}I$ 系英国 Amersham 公司产品(编号IMS 30),放射性浓度 3.7×10^{10} Bq/mL。层析胶DEAE Sepharose CL 4B、Lentil Lectin Sepharose 4B、CNBr-activated Sepharose 4B和Wheat germ Lectin Sepharose 6MB 等购于 Pharmacia 公司。玻璃纤维滤膜 GF/C 是 Whatman 公司产品。β－银环蛇神经毒素、Hepes 及几种蛋白酶抑制剂购于 Sigma 公司。其他各种试剂皆为国产分析纯或保证试剂。

2 结果与讨论

2.1 β－BuTX 结合蛋白的纯化步骤

我们以前曾做过大鼠膈肌 β－BuTX 结合蛋白初步纯化的尝试(沈国光, 1995a)。本实验是在这一基础上探索进行的。膜蛋白的去垢剂增溶抽提采纳 Betz 实验室从小鸡脑分离 β－BuTX 结合蛋白所用的高 K 离子浓度(0.4 mol/L)的条件,在不降低原膈肌膜悬液的比结合活性的前提下,抽提效率可大于70%。

膜蛋白抽提液的初步纯化依旧采取 DEAE 阴离子交换层析和小扁豆凝集素亲和层析这两步。第1步离子交换层析不仅压缩了原抽提液的体积,有利于后面的操作,而且洗脱液的比结合活性提高了

一个数量级。小扁豆凝集素亲和层析洗脱液的比结合活性则在此基础上又进一步提高了近 20 倍。这样，本实验初步纯化产物的比活已高于文献报道的从小鸡脑分离 β－BuTX 结合蛋白的最终产物的比活约一个数量级（Schmidt 等，1988）。

银环蛇毒素亲和层析是进一步纯化工作的关键，我们用高离子强度的条件洗脱结合蛋白。但为了测定洗脱液的活性，必先将其经透析脱盐。这一步层析洗脱液的比结合活性接近 500 pmol/mg 蛋白，比上一步又提高了近 5 倍。但由于蛋白总量大幅下降，得率也进一步降低至 10%以下。

最后我们采用了麦胚凝集素亲和层析，前一步的洗脱液不用透析直接上柱，不仅起到了脱盐的作用，还使纯化产物的比活性又提高了约一倍，达到 1 nmol/mg 蛋白的水平。此时的总结合活性得率仅 3%左右。

2.2　产物的纯度分析

大鼠膈肌 β－BuTX 结合蛋白分离过程的各步产物的纯度分析，主要依据对它们比结合活性的测定。在分离的最初几步，我们依据组织匀浆、增溶抽提液及层析洗脱液与 ^{125}I－β－BuTX 的饱和结合实验数据，用 Scatchard 方法分析其最大结合量，计算其比结合活性。但分离的最后两步亲和层析的产物，由于累计得率很低，蛋白量仅微克级，给测定工作带来一定的困难。在估计产物的比结合活性时，我们只测定了接近饱和值的一个点。根据以前的饱和结合实验数据推断，确定了在同位素标记毒素的浓度为 5 nmol/L 时，测定其结合量（此点的结合量约为饱和值的 60%左右）。表 1 概括了整个纯化过程各步的有关数据。

表 1　大鼠膈肌 β－银环蛇神经毒素结合蛋白的纯化

Table 1　Purification of rat diaphragm β-BuTX-binding protein

纯化步骤（purification step）	总蛋白量/mg	总结合活性/pmol	比结合活性/pmol·mg^{-1}	得率/%	纯化倍数（fold）
膈肌膜制备物（membrane preparation）	320	70.4	0.22	100	1
增溶抽提液（detergent extract）	118	52	0.44	74	2
DEAE 离子交换层析洗脱液（DEAE sepharose eluate）	5	27	5.4	38	25
Lentil Lectin 层析洗脱液（lentil lectin sepharose eluate）	0.098	9.7	99	14	450
β－BuTX 亲和层析洗脱液（β-BuTX affinity column eluate）	0.012	5.8	480	8.2	2 200
WGL 亲和层析洗脱液（WGL sepharose eluate）	0.002	1.96	980	2.8	4 400

表中数据系 3 次实验的平均值（the data are the means of three experiments）。

假定此结合蛋白（可能包含多个亚基）的分子量大约 400 kD，那么纯蛋白的理想比结合活性应该是 2.5 nmol/mg 蛋白。按上表中所列最终纯化产物的比结合活性（1 nmol/mg）推算其饱和结合量约为 1.7 nmol/mg，再考虑到产物中还可能存在一些已失去结合活性的蛋白，可以认为最终产物的纯度已接近期望值。

2.3　纯化的结合蛋白的电泳分析

纯化的 β－银环蛇毒素结合蛋白制品经 SDS 不连续缓冲液系统聚丙烯酰胺凝胶电泳（改进的 Laemmli 方法），然后用银染法显色。蛋白电泳凝胶用数码相机拍照，并经数码凝胶图像分析系统（Tanon GIS－120D）处理。图 1 即为该毒素结合蛋白的最终纯化产品的电泳图谱数码相片。

电泳图谱上只有两个主要条带，它们的分子量分别为 61 和 69 kD，而其他杂蛋白在银染的条件下也十分浅淡模糊，这表明蛋白纯度已较高，这与活性测定的结果是一致的。现在尚不能判断这两个分子量较接近的多肽是否为共纯化的两个相关蛋白或

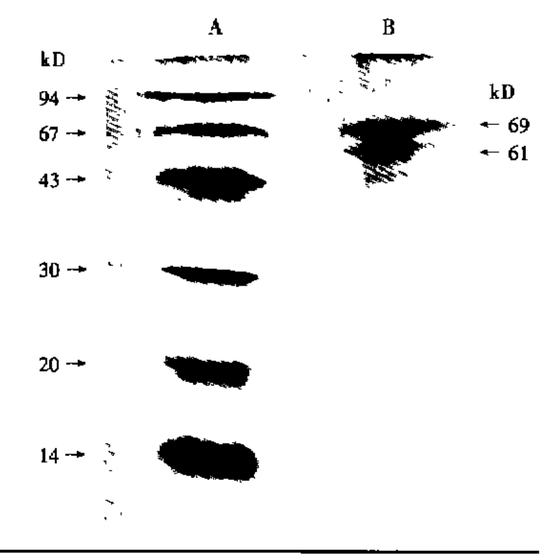


图 1　纯化蛋白质制品的电泳图谱

Fig.1　Electrophoresis pattern of the purified preparation of β-BuTX-binding protein

亚基，或者较小分子只是较大分子蛋白降解后的大片段。

为了进一步分析、鉴定大鼠膈肌的β－银环蛇毒素结合蛋白的结构和功能，我们希望得到该结合蛋白的部分氨基酸顺序，以便进行相关的分子生物学工作。这里报告的蛋白纯化流程可为氨基酸测序提供合乎纯度要求的蛋白样品。但由于得率甚低，要获取足够量的蛋白样品，尚需较大工作量的积累。我们目前正在进行这项工作。

参 考 文 献

沈国光，张新妹，徐 科，1995a. 大鼠膈肌来源的β－银环蛇毒素结合蛋白的一些结合性质[J]. 科学通报，**40**(14)：1322～1325. [Shen G G, Zhang X M, Xu K, 1995a. Binding properties of β-BuTX binding protein from rat diaphragm muscle. *Chinese Science Bulletin*, **40**(19)：1647－1651.]

沈国光，卓晓亮，张新妹等，1995b. 大鼠膈肌β－银环蛇毒素结合蛋白的部分纯化及其鉴定[J]. 科学通报，**40**(23)：2181～2184. [Shen G G, Zhuo X L, Zhang X M *et al*, 1996. Characterization and partial purification of β-BuTX-binding protein from rat diaphragm muscle. *Chinese Science Bulletin*, **41**(10)：852－857.]

Dreyer F, Penner R, 1987. The action of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminal[J]. *J. Physiol*, **386**：455－463.

Greenwood F C, Hunter W M, 1963. The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity[J]. *Biochem. J.*, **89**：114－117.

Schmidt R R, Betz H, 1988. The β-bungarotoxin-binding protein from chick brain: binding sites for different neuronal K^+ channel ligands co fractionate upon partial purification[J]. *FEBS Lett.*, **240**(1, 2)：65－70.

Stansfeld C E, Marsh S J, Parcej D N *et al*, 1987. Mast cell degranulating peptide and dendrotoxin selectively inhibit a fast-activating potassium cuurent and bind to common neuronal proteins[J]. *Neurosci*, **23**(3)：893－902.

PURIFICATION OF β-BUNGAROTOXIN-BINDING PROTEIN FROM RAT DIAPHRAGM MUSCLE

SHEN Guo-Guang XU Ke

(*Shanghai Institue of Physiology, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031 *shengg@sunm.shcnc.ac.cn*)

Abstract: β-Bungarotoxin-binding sites exist in the presynaptic membrane of rat phrenic nerve with a relatively high density. The purified β-bungarotoxin-binding protein was obtained from rat diaphragm muscle by a few steps (including homogenization, detergent solubilizaton, ion exchange chromatography, lectin affinity chromatography and β-bungarotoxin affinity chromatography) with a total yield of 3%. The specific binding activity of the purified protein preparations was around 1 nmol/mg protein. The pattern of SDS discontinuous buffer system polyacrylamide gel electrophoresis of the final protein preparation showed that two peptides were co-purified and their molecular weights were 61 and 69 kD, respectively.

Key words: β-bungarotoxin-binding protein; Rat diaphragm; Protein purification